The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase
Author(s)	Yamanishi, Ayako
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26316
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

〔論文題名：Thesis Title〕

Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase
(ブルーム症候群ヘリカーゼ遺伝子の一過性欠損状態におけるマイクロホモロジーを有したゲノム再構成の亢進)

専攻名 Division　：予防環境医学　　学位申請者 Name　：山西　絢子

〔目　的(Purpose)〕

近年登場した次世代シークエンサーにより、ヒトのがん細胞では、ゲノム配列の挿入、欠失、増幅などのゲノム再構成によるヘテロ接合性の消失(LOH ; loss of heterozygosity)が、多数生じていることが明らかになった。しかし、このがんゲノム解析は、がん化した最終段階のゲノム状態を分析しているため、がん化に至る初期段階のゲノム変化については不明であり、これまで解析方法が存在していなかった。そこで我々は、多様な種類のがんを発症させるブルーム症候群ヘリカーゼ遺伝子(Blm遺伝子)の欠損が、がん初期段階のゲノム変化を解析する上で有用ではないかと考えた。本研究では、一時的にBlm遺伝子欠損状態を出現させうるマウスES細胞を作製し、LOHが生じたクローンに対して、詳細なゲノム解析をすることで、がん発症初期段階におけるゲノム変化について明らかにすることを目的とする。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

Blm遺伝子欠損状態のゲノム変化を解析するため、ドキシサイクリン(dox)依存的にBlm遺伝子をオフにできるF1 (B6×129)タイプのマウスES細胞を樹立した。また、Aprt (adenine phosphoribosyl transferase)を標的遺伝子とし、Aprt遺伝子が欠損した細胞を、2-FA (2-Fluoroadenine) を用いて選択することで、5タイプのLOH（交差、非交差、染色体の倍加、染色体の全欠損、染色体の一部欠失）が生じた細胞を検出できるシステムを構築した。2-FA耐性を示した細胞が、どのタイプのLOHであるのか調べるために、SNP(single nucleotide polymorphism)解析とCGH(comparative genomic hybridization)アレイを併用した。さらに、細胞がよりLOHを生じやすい状況をつくるため、Aprt遺伝子のセントロメア側に、哺乳類には存在しないI-SceI制限酵素サイト(I-SceI site)を挿入し、人為的にDSB(double strand break)を生じさせる細胞を樹立した。

この細胞を、dox非添加群におけるDSB非挿入群またはDSB挿入群、dox添加群におけるDSB非挿入群またはDSB挿入群に分類し、各々の条件下で生じるLOHを2-FAを用いて選択した。そして、2-FA耐性を示したクローンに対してSNP解析を行った。その結果、Blm遺伝子単独欠損状態において生じたLOHは、すべて交差反応によるもので、その場所は染色体上においてランダムであった。一方、Blm遺伝子欠損状態とDSBを同時に生じさせた状態では、LOHは主に交差反応により生じていたが、その場所はDSBを生じさせた近傍で増加した。さらに、Aprt遺伝子近傍でLOHが生じた細胞についてCGHアレイを用いて解析した結果、これまでみられなかった単純な交差反応では説明できない、ゲノムの欠失や欠失と挿入が伴うゲノム再構成により生じたLOHが認められた。このゲノム再構成は、がん細胞でみられるゲノム再構成に似ていることから、Blm遺伝子欠損状態におけるDNA損傷は、細胞ががん化する原因の１つであることが示唆された。そして、今回検出された欠失を伴うゲノム再構成は、マイクロホモロジーを介して結合していたことから、複製機構を利用したFoSTeS (fork stalling and template switching)又はMMBIR (microhomology-mediated break-induced replication)のメカニズムを使って生じたものと考えられる。

〔総　括(Conclusion)〕

マウスES細胞において、Blm遺伝子欠損状態とDSBを同時に生じさせると、マイクロホモロジーを有したゲノム再構成が引き起こされることが判明した。これは、がん細胞でみられるゲノム再構成と類似していることから、がん発症初期におけるゲノム変化の解明に繋がることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　山西 絢子

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	[illegible]
	副　査	大阪大学教授	藤堂 剛
	副　査	大阪大学教授	辻本 賢英

論文審査の結果の要旨

次世代シークエンサーにより、ヒトのがん細胞ではゲノム再構成によるLOH(loss of heterozygosity)が多数生じていることが明らかになった。しかし、このがんゲノム解析はがん化した最終段階のゲノム状態を分析しているため、がん化に至る初期段階のゲノム変化については不明であった。申請者は、多様な種類のがんを発症させるBlm(Bloom syndrome gene)遺伝子に注目し、Blm遺伝子欠損状態でDSB(Double strand break)を生じさせると、ゲノムの欠失や欠失と挿入が伴うLOHが起きることを、マウスES細胞を用いて明らかにした。また、この欠失を伴うゲノム再構成はマイクロホモロジーを介して結合していたことから、複製機構を利用したFoSTeS(fork stalling and template switching)又はMMBIR(microhomology-mediated break-induced replication)により生じたものと考えられる。

本論文は、Blm遺伝子欠損状態でDSBを生じさせると、マイクロホモロジーを有するゲノム再構成が引き起こされることを明らかにすると同時に、このゲノム再構成が、がん細胞でみられるゲノム再構成と類似していることから、がん発症初期段階におけるゲノム変化の解明に大きく貢献すると考えられる。よって、博士の学位授与に値する。